

007

MEIO SELETIVO PARA ISOLAMENTO DE *Armillaria* sp.¹

Nei Sebastião Braga Gomes²

Celso Garcia Auer³

RESUMO

Este trabalho apresenta um meio seletivo capaz de isolar *Armillaria* sp. O meio seletivo foi baseado no meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com benomyl, cloranfenicol, ácido láctico, etanol e rosa bengala. Com este meio prático e barato, o patógeno pode ser isolado de fragmentos de casca, placas miceliais e rizomorfias ativas, coletadas de árvores doentes de *Pinus* spp.

INTRODUÇÃO

Os estudos laboratoriais com o fungo basidiomiceto *Armillaria* sp., agente causal da podridão de raízes em *Pinus*, têm sido feitos com isolados obtidos de material doente. O isolamento deste fungo, em meio de cultura, pode se tornar difícil devido ao seu crescimento lento, que facilita a sobreposição das culturas por contaminantes (fungos e bactérias) de crescimento mais rápido. Assim, o isolamento de *Armillaria* necessita de meios seletivos contendo substâncias inibidoras dos contaminantes (fungicidas e bactericidas) que não tenham efeito sobre o patógeno e de outras substâncias que ativem seu crescimento, para assim tornar-se mais fácil sua recuperação a partir dos tecidos doentes de plantas.

A escolha ou o desenvolvimento de um meio específico para isolamento de patógenos de plantas baseia-se nas qualidades que este possa apresentar em inibir os competidores pelo substrato, os contaminantes indesejados, e pela melhoria no isolamento e na diferenciação seletiva do patógeno em estudo (Lockwood, 1977).

Princípios ativos como orto-fenilfenol, pentacloronitrobenzeno, vancomicina, pimáricina, benomyl, sulfato de estreptomicina e outros têm sido empregados para isolamento de basidiomicetos de solo e madeira, pelas propriedades inibitórias aos contaminantes (Tuite, 1969). Certos agentes antimicrobianos utilizados nos meios de cultura apresentam o inconveniente de serem de difícil aquisição, seja pela ausência no mercado ou pelo custo elevado. Muitas vezes, tais substâncias necessitam ser importadas.

Os meios BDA e Malte-Ágar podem ser empregados para o isolamento de *Armillaria*, porém precisam ser acidificados ou suplementados com fungicidas (Morrison et al., 1991). O meio de Kuhlman-Hendrix que era empregado para o isolamento de *Heterobasidion annosum*, também foi recomendado para *Armillaria* (Kuhlman & Hendrix, 1962), porém várias substâncias não existem mais no mercado. Com base nas poucas informações sobre meios

¹ Parte da tese em desenvolvimento na *Embrapa Florestas*

² Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná. Bolsista do CNPq.

³ Pesquisador da Embrapa Florestas auer@cnpf.embrapa.br

seletivos para *Armillaria*, decidiu-se desenvolver um meio seletivo tendo como base o meio BDA suplementado de agentes antimicrobianos de fácil aquisição.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos iniciais de isolamento de *Armillaria* sp., a partir de tecidos doentes de *P. elliotii* e *P. taeda*, foram feitos com os meios BDA (batata-dextrose-ágar), Malte-Ágar, meio de Martin Modificado e meio de Kuhlman-Hendrix, segundo formulações descritas por Tuite (1969). Com os meios BDA ou Malte-Ágar, houve elevada contaminação com fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus*. Quando se utilizou o meio de Martin Modificado houve diminuição na contaminação bacteriana, entretanto surgiram as colônias de *Trichoderma*. O meio de Kuhlman-Hendrix permitiu o isolamento e cultivo de *Armillaria*, porém com frequência ainda houveram contaminações fúngicas.

Para superar os problemas de contaminação por fungos adicionou-se ao meio o fungicida benomyl e o corante rosa bengala, de caráter fungistático. Contra as bactérias, utilizou-se cloranfenicol e ácido láctico bactericida. Etanol foi adicionado ao meio, por ser um potente estimulador do crescimento micelial e da produção de rizomorfias de *Armillaria*. Este fungo pode metabolizar ou tolerar estes compostos, que de outro modo inibem os principais contaminantes durante o isolamento (Garraway et al., 1991). As concentrações dos produtos químicos empregadas foram estabelecidas a partir de informações da literatura, de modo a reunir vários princípios ativos tóxicos aos contaminantes, inócuos para a *Armillaria*.

Para a preparação do meio seletivo, usou-se infuso de 200 g de batata picada, 20 g de dextrose e 20 g de ágar (constituintes do meio BDA), ao qual adicionou-se 3,3 mg de rosa bengala, 20 mg de benomyl, 250 mg de cloranfenicol, 10 ml de etanol 96 ° G.L. e 1 ml de solução de ácido láctico a 25 %, completando-se o volume a 1000 ml de água destilada. Todos os ingredientes foram misturados antes da autoclavagem (120 °C, 1 atm., 15 min.). O meio foi vertido em placas de Petri, tubos de ensaio e vidros de penicilina para verificar a viabilidade de uso. Para testar a eficiência do meio, fragmentos de tecidos doentes, rizomorfias e de placas miceliais foram retirados de plantas doentes de *P. elliotii*, *P. taeda* e de outros hospedeiros de *Armillaria* e transferidos para as placas, tubos e vidros de penicilina contendo o meio em teste.

Também, pode ser utilizado do caldo de batata mais dextrose e ágar já pronto, comumente denominado de Potato-Dextrose-Agar ou Caldo de Batata-Dextrosado com os mesmos produtos (fungicida e antibióticos).

As placas e outros recipientes com o meio foram incubados na temperatura de 22 °C, dentro da faixa de temperatura considerada ótima (15 a 25 °C) para *Armillaria* sp. determinada por Gomes et al. (2002), por um período de dois meses, a fim de analisar o comportamento do patógeno e dos contaminantes presentes, frente ao novo meio.

RESULTADOS

O meio elaborado foi mais eficiente na inibição de *Trichoderma* spp. e de *Bacillus* spp., permitindo uma melhoria na obtenção de isolados de *Armillaria* sp., frente ao meio BDA e Meio de Martin Modificado. Com este meio pode-se isolar facilmente o fungo a partir de fragmentos internos de casca doente, de placas miceliais do patógeno na entre-casca da árvore e de rizomorfias ativas. As culturas jovens apresentaram crescimento lento, típico de culturas de *Armillaria*, com coloração inicialmente clara passando a escura, com liberação de exsudatos escuros na forma de halo ao redor da colônia e profusa produção de rizomorfias. Verificou-se que, as colônias eram menores que as obtidas em meio BDA, porém com grande produção de rizomorfias. Em alguns isolados, as rizomorfias surgem primeiro e a colônia se estabelece depois. O importante é formam-se colônias puras para posterior cultivo e manutenção em BDA ou Malte-Ágar sem antibióticos. Pode ser empregado, também, com sucesso na purificação de culturas contaminadas.

O tipo de recipiente testado (placas de Petri, tubos de ensaio e vidros de penicilina) não alterou a eficiência do meio, facilitando o isolamento de *Armillaria* e impedindo o desenvolvimento dos contaminantes. O uso de vidros de penicilina com o meio seletivo é adequado ao isolamento em condições de campo ou próximo a este, devido ao pequeno volume do vidro e de meio que é transportado.

CONCLUSÕES

Conclui-se que este meio, de fácil preparo e uso, é adequado para o isolamento, cultivo e purificação de *Armillaria*, pois reúne produtos de baixo custo e de fácil aquisição. Provavelmente, o meio desenvolvido poderá ser utilizado no isolamento de outros basidiomicetos, agentes de podridão de raízes ou apodrecedores de madeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LOCKWOOD, J. L. **Curso avançado sobre fitopatógenos de solo (soil borne diseases)**. Piracicaba, Departamento de Fitopatologia/ESALQ-USP, 1977. 41p. (datilografado).
- GARRAWAY, M. O.; HÜTTERMAN, A.; WARGO, P. M. Ontogeny and physiology. In: SHAW III, C.S.; KILE, G.A. **Armillaria root disease**. Washington, Forest Service-USDA, Agriculture Handbook n. 691, cap. 3. p.21-47, 1991.
- GOMES, N. S. B.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Temperaturas para desenvolvimento de *Armillaria* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 69, p. 278-279. 2002.
- KUHLMAN, E. G.; HENDRIX, F. F. A selective medium for the isolation of *Fomes annosus*. **Phytopathology**, v.52, n.12, p. 1310-1312. 1962.
- MORRISON, D. J.; WILLIAMS, R. E.; WHITNEY, R. D. Infection, disease development, diagnosis, and detection. In: SHAW III, C.S.; KILE, G.A. **Armillaria root disease**. Washington, Forest Service-USDA, Agriculture Handbook n. 691, cap. 3. p.62-76, 1991.
- TUITE, J. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria**. Burgess Publishing company, Minneapolis, 1969, 239p.